

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 59-204200

(43)Date of publication of application : 19.11.1984

(51)Int.Cl. C07H 21/02

G01N 33/54

// C12Q 1/68

G01N 33/50

(21)Application number : 58-075878

(71)Applicant : WAKUNAGA SEIYAKU KK

(22)Date of filing : 28.04.1983

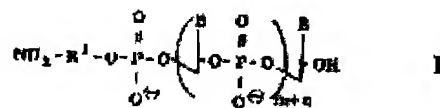
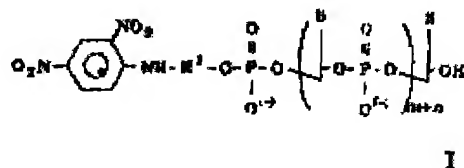
(72)Inventor : MIYOSHI KENICHI  
SUZUKI MASANORI  
FUWA TORU

## (54) 2,4-DINITROPHENYLNUCLEOTIDE DERIVATIVE AND ITS PREPARATION

(57)Abstract:

**NEW MATERIAL:**2,4-Dinitrophenyl-

oligodeoxyribonucleotide of formula I (m and n are 0 or natural number; R1 is hydrocarbon residue; B is base constituting nucleotide).

**USE:** Affinity probe for nucleic acid. Since the compound is devoid of DNP at the base part of the nucleotide, it has stable melting point (Tm value) and can be stored stably.**PREPARATION:** The compound can be prepared by bonding 2,4-dinitrobenzene to the terminal amino group of the oligonucleotide derivative of formula II.

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭59-204200

⑫ Int. Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和59年(1984)11月19日
C 07 H 21/02		7252-4C	
G 01 N 33/54		H 7906-2G	発明の数 2
J C 12 Q 1/68		8213-4B	審査請求 未請求
G 01 N 33/50		Z 8305-2G	

(全 9 頁)

⑭ 2, 4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体およびその製造法

広島県高田郡甲田町下甲立1624  
湧永製薬株式会社中央研究所内

⑮ 発明者 不破亨

広島県高田郡甲田町下甲立1624  
湧永製薬株式会社中央研究所内

⑯ 特 願 昭56-75878

⑰ 出 願 昭58(1983)4月28日

⑱ 発 明 者 三好健一

⑲ 出 願 人 湧永製薬株式会社

広島県高田郡甲田町下甲立1624  
湧永製薬株式会社中央研究所内

大阪市福島区福島三丁目1番39号

⑳ 発 明 者 鈴木正則

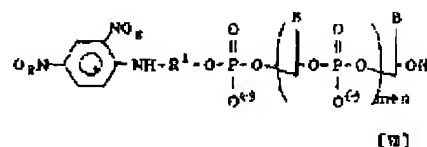
㉑ 代 理 人 弁理士 猪股清 外3名

## 明 細 書

1. 発明の名称 2, 4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体およびその製造法

2. 特許請求の範囲

1. 下式〔Ⅱ〕で示される2, 4-ジニトロフェニル-オリゴアザキシリボスクレオチドであることを特徴とする、2, 4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体。



〔ただし、mおよびnはそれぞれ0または任意の自然数であり、R<sup>1</sup>は2個の置換または分岐の炭化水素基であり、Bはスクレオチドを構成する炭素である。Bが置換基存在するとき

は、それらは同一でも異なってもよい。〕

2. 糖基Bがアデニン、チミン、シトシンおよびグアニンからなる群より選ばれたものである、特許請求の範囲第1項記載の2, 4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体。

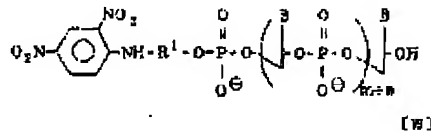
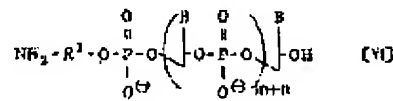
3. R<sup>1</sup>が炭素数2〜20の置換または分岐鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第1項または第2項記載の2, 4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体。

4. mが0または5までの自然数、nが0または40までの自然数である、特許請求の範囲第1〜3項のいずれか一項に記載の2, 4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体。

5. 下式〔Ⅲ〕で示されるオリゴスクレオチド誘導体の末端アミノ基と2, 4-ジニトロベンゼンを結合させて下式〔Ⅱ〕で示される2, 4-ジニトロフェニル-オリゴアザキシリボスクレオチドを得ることを特徴とする、2, 4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体の製造法。

## 特開昭59-204200(2)

1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンである。特許請求の範囲第5項記載の2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体の製造法。



〔ただし、 $\text{R}^1$ および $n$ はそれぞれ0または任意の自然数であり、 $\text{R}^1$ は2個の置換または分岐の炭化水素残基であり、Bはヌクレオチドを構成する塩基である（Bが塩基が存在するとき、それらは同一でも異なってもよい）。〕

6. アミノ基と2, 4-ジニトロベンゼンとの結合を、アミノ基と1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンとの脱ハロゲン化水素反応によつて行なわせる、特許請求の範囲第5項記載の2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体の製造法。

7. 1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンが

フェニル（以下DNPと略す）基を被置に結合させた、DNAプローブが開發されている（Nucleic Acids Rev., 30, 6787-6796 (1982)）。彼らは、アデノシン三リン酸(ATP)のDNP誘導体をDNA鎖に取り込ませ、相補的塩基配列を持つDNAにハイブリダイズさせたのち、DNPに対するウザギ抗血清およびパーオキシダーゼで標識したウザギ抗血清グロブリンG型(IgG)に対するヒツジ抗血清を順次加えて目的DNAを抽出している。ここで用いたDNA鎖は、天然から取り出したフラグメントである。

しかし、本発明者らの知るところによれば、このようにして調製されるDNP-ヌクレオチド誘導体には下記のような問題点がある。

(a) ヌクレオチドの塩基部分にDNPを含有するため、使用オリゴヌクレオチド固有の融解温度（ $T_m$ 値）に低下を生じる。

(b) 融解温度の低下は、DNAの

## 3. 発明の神髄な説明

## 発明の背景

## 技術分野

本発明は、一般に、2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体に関する。さらに具体的に、本発明は、ヌクレオチドの塩基以外の部分に2, 4-ジニトロベンゼンを結合させてなる2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体に関する。本発明は、また、このような2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体の製造法にも関する。

## 先行技術

放射線同位元素を使わず、特異な抗体や酵素によつて検出することができる、あるいはオリゴヌクレオチド誘導体は、検疫用プライミターグループとして興味を持たれている。

近年、Vincent らによつて、2, 4-ジニトロ

フェニルヌクレオチド誘導体は、その応用範囲が狭く、有用性が限定されているのが現状である。

## 発明の概要

## 要 旨

本発明は上記の欠点を与えることを目的とし、特定のオリゴデオキシリボヌクレオチドのヌクレオチド塩基以外の特定の部位に2, 4-ジニトロベンゼンを結合させてなるDNP-ヌクレオチド誘導体によつてこの目的を達成しようとするものである。

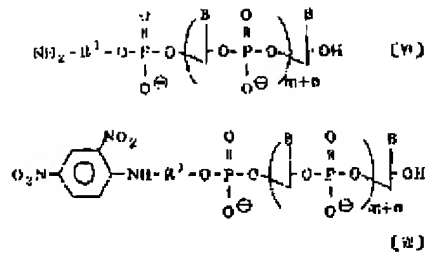
従つて、本発明によるDNP-ヌクレオチド誘導体は下式〔Ⅷ〕で示されるDNP-オリゴデオキシリボヌクレオチドであること、を特徴とするものである。

また、本発明によるDNP-ヌクレオチド誘導体の製造法は、下式〔Ⅷ〕で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の末端アミノ基と、4-ジニトロベンゼンとを反応させることによる。

JP,59-204200,A

☒ STANDARD ☐ ZOOM-UP ROTATION ☐ No Rotation ☐ REVERSAL

## 特開昭59-204200(3)



〔ただし、 $m$ および $n$ はそれぞれ0または任意の自然数であり、 $\text{R}^1$ は2個の置換または分岐鎖の炭化水素残基であり、 $\text{R}^2$ はヌクレオチドを構成する基であり、 $\text{B}$ が糖基存在するときは、それらは同一でも異なってもよい。〕

## 発 明

本発明者らの合成したDNP-オリゴデオキシリボヌクレオチドは、放射線検出用放射能アフィニティプローブの応用を認識することができ、下記のような長所をもつものである。

(1) ヌクレオチドの塩基部分にDNPを含有しないので、酸解阻礙(TH基)に感化を生じることが

なくて安定である。

(2) いくつもの塩基配列をもつDNP-オリゴヌクレオチドも合成可能である。

(3) プローブとして短鎖オリゴマーで十分である。

(4) 合成が非常に簡単であつて大量合成が可能であり、また長期保存も可能である。

(5) プライマー(筋合成の際のDNA断片)としても利用できる。

最近、報告には、筋合成の合成オリゴヌクレオチドを用いてターゴロビンの遺伝子調の断片を行なつており(Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 80, 276-282(1983)、遺伝子中のわずかな一つの塩基配列の違いも検出できる合成オリゴヌクレオチドが各種遺伝子断片断に適用であることを示している。

彼らは合成オリゴヌクレオチドの放射能標記(32P)を使用した。代わりに本発明者らが開発したDNP-ヌクレオチド誘導体を用いることができれば、非常に有用なことは明白であろう。

このような長所があるところから、本発明の

DNP-ヌクレオチド誘導体の利用用途の拡大も考えられる。

すなわち、たとえば、DNP-オリゴヌクレオチドは、非放射線検出用アフィニティプローブとして、あるいはプライマーとして、利用可能であることは前記したところであつて、その検出方法は抗体による沈降、酵素免疫活性測定、蛍光検出、染色体による可視化等々、多岐であり、また本発明のDNP-ヌクレオチド誘導体は放射能プローブ(32P)に比べて検出の簡便、コスト、純度の向上および保存性の点でも有利である。

なお、DNP基は、市販のウサギ抗血清(たとえばMiles Laboratories, Code No. 61-006-1)または、DNPに対するモノクローナル抗体によつて容易に検出することができる。

## 発明の具体的説明

## DNPヌクレオチド誘導体(11)

本発明によるDNPヌクレオチド誘導体は、前記の式(11)で表されるものである。

式中、記号  $\text{R}^1$  は、2'-デオキシリボヌクレオチドの3'-および5'-水酸基を除いたデオキシリボヌクレオチド残基を示すのに使用されているものであつて、具体的に下記の構造のものである。



置換基 $\text{B}$ はヌクレオチドを構成する塩基を指し、通常はアデニン、チミン、シトシンまたはグアニンである。化合物(11)中に $\text{B}$ が塩基存在するときは、それらは同一でも異なつてもよい。

$m$ および $n$ は、それぞれ0または自然数を示す。本発明DNPオリゴヌクレオチド誘導体の重合度は $m+n$ で表されているのは、本発明の好ましい製造法で重合度がそれぞれ $m$ および $n$ のフラクションを混合させていることによるものである(詳細後記)。その場合の $m$ は実数的には0~6、特に1~4、 $n$ は実数的には0~40、特に0~20、

## 特開昭59-204200(4)

である。

基 $R^1$ は、化合物[III]の置換部分とDNP部分とを連結する二価の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖である。これは、特に炭素数2〜20程度の直鎖または分岐鎖のアルキレン基が適当である。好ましい $R^1$ は、炭素数2〜6のアルキレン基である。

## 化合物[III]の合成

## 一般的説明

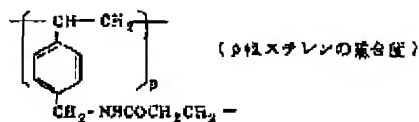
化合物[III]、すなわち本発明によるDNP-ヌクレオチド誘導体、は合目的的な任意の方法によって合成することができる。

一つの好ましい方法は、前記の式[III]のオリゴヌクレオチド誘導体、すなわちオリゴデオキシヌクレオチドの5'-末端リン酸基に基 $R^1$ を介して一般アミノ基を導入されたもの、のアミノ基にDNPを結合させることからなるものである。

一方、式[III]の化合物は、オリゴヌクレオチドの合成および生成オリゴヌクレオチドの5'-末端磷酸基上での一般アミノ基の導入からなる方法で合成することができる。

イルブアニン、N-インブチリルブアニン、 $N^6$ -ベンゾイルグアニンおよびチミン(すなわち、保護不変)より選択される。

⑥ スーパーを介した担体であつて、通常は下記のものである。



## 化合物[III]の合成

一般にオリゴヌクレオチド合成法としては、トリエステル法、ホスファイト法およびそれぞれの適相法および変相法がある。本発明者らは既に前掲法によるオリゴヌクレオチド製造技術を確立しており、化合物[III]の合成には本発明者らの下記の方法が好ましい。

Tetrahedron Letters 1979, 8635(1979)

Nucleic Acids Research 8, 5473(1980)

Nucleic Acids Research 6, 5491(1980)

第1図は、この好ましい合成法の一例を示すフローチャートである。フローチャート中の記号は、下記の意味を持つ(その意図ないし解題は、記載した通りである)。

$R^0$  リン酸基を保護する置換基であつて、通常オルトクロロフェニル基が用いられる。

$R^1$  二価の炭化水素置換基である。

$R^2$  5'-末端水酸基の保護基であつて、通常ジメトキシトリチル基が用いられる。

$R^3$  他のすべての保護基が安定な条件で容易に脱離されて、リン酸ジエステルを与えることができる置換基であつて、通常シアノエチル基が用いられる。

$R^4$  アミノ基の保護基であつて、通常トリフルオロメチル基が用いられる。

$\alpha$   $\alpha$ より小さい任意の自然数。

$m$  0または任意の自然数。

$n$  0および任意の自然数。

$B$  塩基を示す。

$B'$  脱離された塩基を示すが、通常は $N^6$ -ベンゾ

Nucleic Acids Research 8, 5507(1980) .

Nucleic Acids Research Symposium Series

7, 201(1980)

また、上記で合成したオリゴヌクレオチドの5'-水酸基にリン酸基を介して一般アミノ基を導入する方法、すなわち化合物[III]の合成法としては、たとえば本発明者らの特開昭57-138136号明細書記載の方法がある。

化合物[III]の合成法をその一実施例について示せば、下記の通りである。すなわち、第1図に示したように、化合物[1]の保護基 $R^3$ を除去したものと化合物[II]の保護基 $R^2$ を除去したものとを結合させ、これらの操作をくり返すことによつて、化合物[III]を合成する。オリゴヌクレオチド化合物[III]の合成法は、上記の通り公知である。

一方、本発明者らの方法(特開昭47-138136号明細書記載)に従つて、式[IV]の化合物を合成する。すなわち、化合物[1]の $R^2$ を除去して5'-水酸基化合物とし、これにリン酸化剤(たとえば、ホスホリトリアゾリド、ホスホジクロリドま

## 特開59-204200(B)

たはホスホジベンゾトリアゾリド等)を作用させてリン酸化し、ついでアミノ基が保護されているアミノアルコール化合物  $R^2-NH-R^1-OH$  [この化合物はオメガ・アミノアルコール ( $NH_2-R^1-OH$ ) のアミノ基を  $R^2$  で保護することにより得ることができる] を結合させることにより、化合物 [IV] を得ることができる (詳細は説明欄を参照)。

この化合物 [IV] の保護基  $R^2$  を除去し、化合物 [IV] の保護基  $R^2$  を除去したものと結合させて、化合物 [V] を合成する。即ち、化合物 [IV] の合成の段の結合と本質的には異なる方法で行なうことができる。

このようにして合成された化合物 [V] の保護基をすべて除去すれば、化合物 [VI] が得られる。保護基 CO— $\text{C}_6\text{H}_4$ — $\text{C}_6\text{H}_4$ —、リン酸トリエステル中のオルト・クロロフェニル基および塩基部分のアシル基は、0.5% のテトラメチルゲアミン・ピリジン・2-カルボアルデヒドのジオキサン-水 (1:1) (V/V) 溶液で処理後、アルカリ処理 (濃アンモニア水) を行なうことにより除去される。  $R^1$  が

とすることによって得ることができる。

両者の結合は、2,4-ジニトロベンゼンの1-位と化合物 [VI] のアミノ基との間の C-N 結合の形成を促進することのできる任意の方法によって行なうことができる。

両者の結合は、一般に、前者の誘導体、すなわち DNP-X (X は 1-置換基) とアミノ基との間の H-X 結合によることによつてである。X としては、ハロゲンが好ましい。X がハロゲンである誘導体、すなわち 1-ハロゲン-2,4-ジニトロベンゼンが好ましいのは、一般に、オリゴヌクレオチドの塩基部分のアミノ基とは反応しないので、水溶液末端基上の一級アミノ基とのみ選択的に反応し、しかも反応操作が簡便だからである。とりわけ、1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンは市販され容易に入手でき、穏かな反応条件で化合物 [VI] のアミノ基との反応が進行する。

1-ハロゲン-2,4-ジニトロベンゼンと化合物 [VI] との反応は、両者の均一溶液中 (溶媒は、たとえば含水アルコール) あいはいは不均一系液中

トリアルコロアセチル基の場合は、アセトニア処理により充分脱脂され、オルトニトロフェニルスルフェニル基である場合はメルカプトエタノール処理が必要である。  $R^1$  として他の保護基を用いた場合は、オリゴヌクレオチド部分が安定な条件で、さらに別の処理を加えることも可能である。なお、デオキシオリゴリボヌクレオチドの合成法は既に各種のものが公知であつて、塩基の種類およびその導入しない除去ならびに結合その他について上記以外の詳細は該種の化学合成に関する成書や文献たとえば「ヌクレオチド・ヌクレオチドの合成」(丸井 1977年)、「核酸有機化学」(化学同人 1978年)、「核酸」(朝倉書店 1979年)、Tetrahedron, 34, 5143(1978)、野合化, 34, 723(1978)および化学の雑誌, 33, 666(1979)等を参照することができる。

## 化合物 [VI] の合成

DNP-オリゴデオキシリボヌクレオチド (化合物 [VII]) は、上記化合物 [VI] の 5'-末端基上の一級アミノ基に 2,4-ジニトロベンゼンを結合

(溶媒は、たとえば水)、ハロゲン化水素捕捉剤 (たとえば、炭酸水素ナトリウム、トリエルアミン、水酸化カリウム等) の存在下、10-50°C 程度の温度で実施することができる。目的生成物は、たとえば抽出によって阻取すればよい。なお DNP 化に關しては、適当な詳説、たとえば「実験化学講座 1、蛋白質の化学 II、第 118 頁」(1976年(丸井(株)発行)等を参照することができる。

## 実 験 例

## 1) フローチヤート

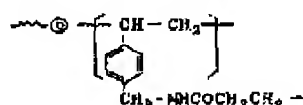
図 2 のフローチヤートに従つて、本発明化合物 (同図の化合物 ①) を製造した。

図 2 中で、記号は次の意味を持つ。

B: ベンゾイル化アデニン

B: アデニン

DMP: ジメチルピリジン



## 例 359-204268(8)

R<sup>9</sup> オルトクロロフェニルR<sup>10</sup> エチルCF<sup>1</sup> シアノエチル

m 2

n' 2

n 12

2) 化合物 [n] (第 2 図の ④) の合成

## 実験 1 - 1

ジメトキシトリサルブアノシン/樹脂 [①]

(樹脂は母体に過ぎないが、樹脂に担持された目的化合物は本発明では樹脂そのものと区別しないので、樹脂に担持された当該化合物を以下において単に樹脂と呼ぶこととする) 300 mg (0.033 mmol) のイソプロパノール-塩化メチレン (15:15, V/V) 溶液 10 ml で 3 回洗浄後、臭化亜鉛の 1.0 M のイソプロパノール-塩化メチレン溶液 8 ml で 5 分間ずつ 4 回反応 (脱トリサル化) をさせて樹脂 [②] を得る。樹脂 [②] をイソプロパノール-塩化メチレン溶液 10 ml で 3 回洗浄し、これにジメトキシナフタ [③] 150 mg (0.1 mmol) のピリジ

ン溶液を加え、共沸させて水を除去とし、トリチレンスルホニルエトトリブアノリド (以下 MSN と略す) 150 mg (0.5 mmol) と熱水ピリジン 2 ml とを加えて 90 分間反応 (混合) させる。反応後、ピリジン 10 ml で 3 回洗浄し、抽出液 (約 10 mg) のジメサルアミノピリジン (以下 DMAF) を含む無水酢酸-ピリジン (1:9, V/V) 溶液 10 ml を添加し 10 分間反応させて未反応 5'-水酸基をアセチル化して保護し、これをピリジンで洗浄して、化合物 [④] (n = 2) を得る。以上のような操作を 6 回くり返して、化合物 [④] (n = 12) を得る。

一方、5'-ヒドロキシ-ジメトキシナフタ [⑤] 800 mg (0.71 mmol) とオルトクロロフェニルホスネジトリブアノリドとを後者のジオキサン溶液 (1.0 mmol, 6 ml) 中で 2 時間反応させ、続いてトリフルオロアセチル-6-アミノヘキサノール 300 mg (1.4 mmol) および 1-メチル-イミダゾール 115 mg (1.4 mmol) を加えてさらに 2 時間反応させる。反応終了後、樹脂を抽出し、抽出

液をクロロホルムに溶解した後、水、0.5 M リン酸二水素ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および 5% の塩化ナトリウム水溶液でそれぞれ洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥する。クロロホルム層を蒸発後、シリカゲルカラムで精製し抽出液として 0~4 倍のメタノール含有クロロホルムを使用し、抽出液を蒸発後ペンタン中に沈下し粉末状の化合物 [⑥] を得る。

上記で合成した化合物 [④] (n = 12) 115 mg, (3.45 μmol) を抽出と同様の方法で脱トリサル化したもの [⑦] 60 mg (0.04 mmol) をトリエチルアミン-ピリジン-水 (1:8:1, V/V) 溶液 3 ml で処理 (脱シアノエチル化) した化合物 [⑧] を加え、無水にしたのち、MANTE 50 mg (0.2 mmol) およびピリジン 1 ml を加え 60 分間反応 (混合) させ、反応終了後ピリジンおよびメタノールで洗浄し、乾燥して、完全に保護されたオリゴヌクレオチド誘導体 [⑨] を得る。

オリゴヌクレオチド誘導体 [⑨] 15 mg を 0.5 M

テトラメチルアンモニウム-ピリジン-2-カルボアルデヒドのジオキサン-水 (9:1, V/V) 溶液 200 μl を加え、反応液中、室温で 24 時間反応させる。反応後、酢酸アンモニウム (2.5 ml) を加えて抽出し、50℃ で一夜反応させる。反応終了後、蒸発し、残渣を蒸発後、水に溶解させてからエーテルで抽出を行なう。水相を蒸発後、セファデックス G-50 (61.5 × 120 cm, 樹脂液は 0.05 M の重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液 pH 7.5) で固相抽出しペンタデカフルフルアルコール [⑩] を得る。

また同様の方法で実験 1 - 2, 1 - 3 および 1 - 4 のようなオリゴヌクレオチド誘導体を得た。以上で合成した化合物を第 1 図に示す。



第 1 表

実験例	m+n	化合物⑩の内容	
		(A) <sub>m</sub>	(B) <sub>n</sub>
1-1	14	AAAAAAAAAAAAAAAA	
1-2	14	TTTTTTTTTTTTTTTT	
1-3	14	GGATGCATCACCACC	
1-4	16	AACTCTGCTGAGAAAGCGC	

ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシンを示す。

これら4種の化合物の高速液体クロマトグラフィーの結果を第3図に示す。A～Dは、それぞれ実験1-1～1-4の化合物についての図である。

3) 2, 4-ジニトロフェニル・ペンタデカアデニル酸〔⑩〕の製造

#### 実験2-1

上記実験1-1で合成したペンタデカアデニル酸等価体〔⑩〕約1.0gを0.1M炭酸水素ナトリウム水溶液(pH8.3)10mlに溶解し、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンのエタノール懸

特開59-288200(ア)

液(50mg/ml)5ml(大過剰)を加えて37℃で2時間反応させた後、20mlを加えエーテル150mlで4回抽出を行ない、2, 4-ジニトロフェニル・ペンタデカアデニル酸〔⑩〕を得る。反応の促進は、高速度液体クロマトグラフィーにより行なつた。

またその際、反応性の比較のため上記で合成したオリゴヌクレオチド〔⑨〕を炭酸水素ナトリウム水溶液をもつ化合物〔⑩〕と同様に1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンと反応させる。

上記実験1-2, 1-3および1-4で合成した化合物〔⑩〕についても実験2-1と同様な操作を行なつて各々について化合物〔⑩〕を製造する。また、反応の比較のため5'-水酸基をもつ化合物〔⑩〕をも製造し、化合物〔⑩〕と1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンとを各々反応させる。このときの実験を各々実験2-2, 2-3および2-4とした。

実験2で製造した化合物を第2表に示す。

第 2 表

実験例	m	化合物⑩の内容	
		(A) <sub>m</sub>	(B) <sub>n</sub>
2-1	12	AAAAAAAAAAAA	AAAAAAAAAAAAAA
2-2	12	TTTTTTT	TTTTTTTTTTTTTT
2-3	12	ATGCATCACCACC	GGATGCATCACCACC
2-4	14	TCTGGTGAAGAGCGC	AACTCTGCTGAGAAAGCGC

ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシンを示す。

以上の結果を第4図(高速度液体クロマトグラフィーの結果)に示す。

第4図は高速度液体クロマトグラフィーの流出パターンを示すものである。图中、1は何れも反応前の化合物そのもの、2は何れも化合物と1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンとを反応させたもののクロマトグラムである。イは実験2-1で式〔⑩〕である化合物、ロは実験1-1で式〔⑩〕である化合物、ハは実験2-2で式〔⑩〕である化合物、ニは実験1-2で式〔⑩〕である化合物、ホは実験2-3で式〔⑩〕である化合物、ヘは実験1-3で式〔⑩〕である化合物、トは実験2-4で式〔⑩〕である化合物、チは実験1-4で式〔⑩〕である化合物について上記のような操作を行なつた際のクロマトグラムを示す。なおピーク上の数値は保持時間を示す。

これらの結果からみれば、式⑩で示される5'-水酸基をもつ化合物(第4図のイ-1, ハ-1,



## 特開59-204204(B)

上記において、高速液体クロマトグラフィーは日本分光HPLC System Tri-Rotorを用い、次の条件により測定を行なった。

カラム :  $\mu$ -Bondapak C18 (Waters)

流速 : 2 ml/分

検出液 : アセトニトリルを含む、20 mM-

TBAH緩衝液 (pH 7.2)

検体濃度 : アセトニトリルの濃度5~14% / 16分(16分以後は14%を脱ける)

## 4. 図面の簡単な説明

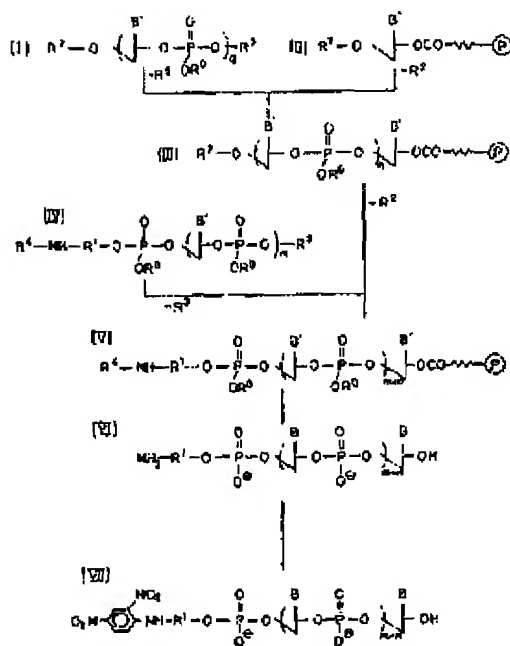
第1図は、本発明の化合物を合成する方法の一例を示すフローチャートである。

第2図は、実施例で示した本発明化合物の製造法のフローチャートである。

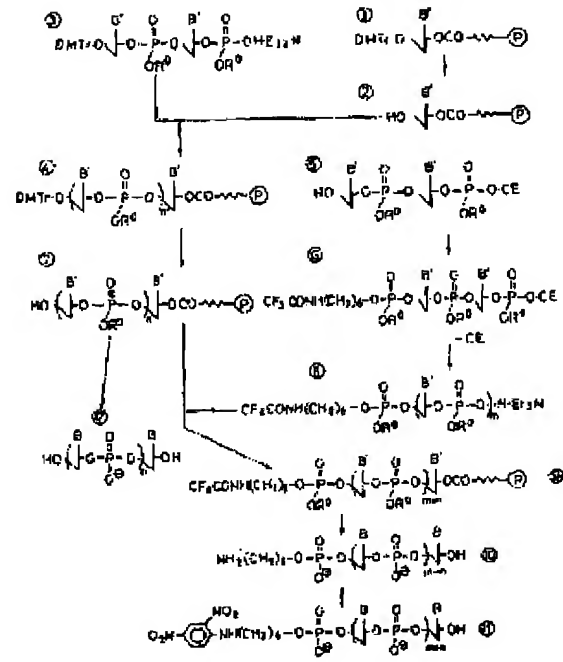
第3図A~Bは、実施例で示した化合物(VI)の高速液体クロマトグラフィーの結果を示す図である。

第4図は、高速液体クロマトグラフィーの検出パターンを示す図である。

第1図

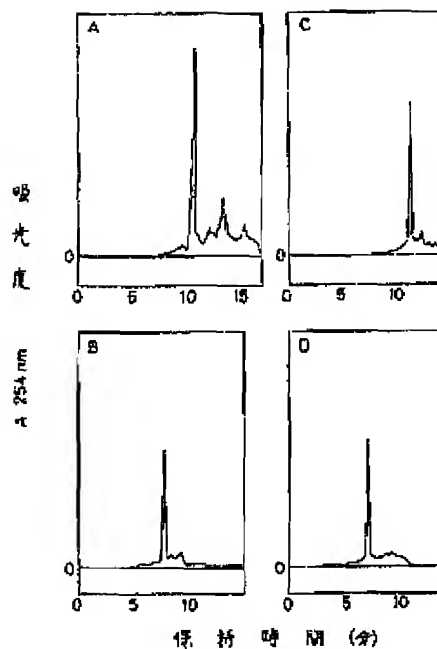


第2図

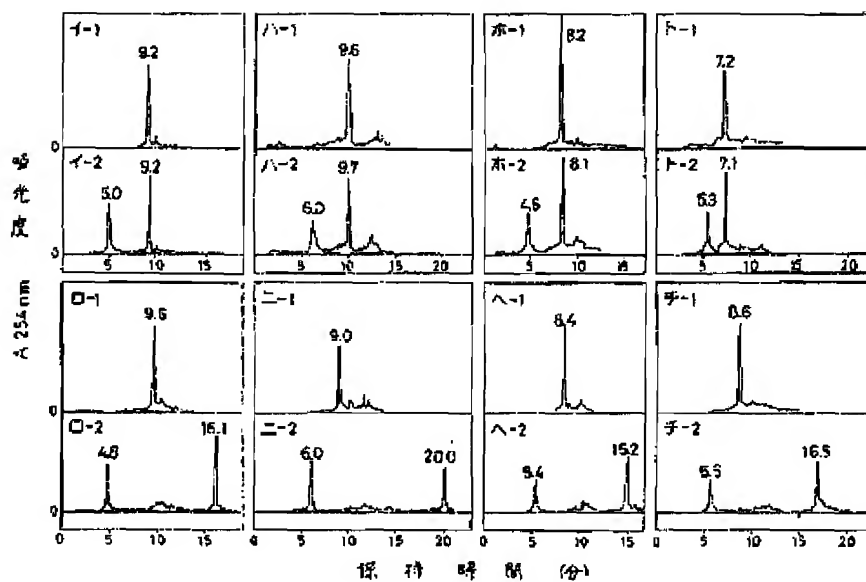


396455-204204(9)

第 3 図



第 4 図



## 特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和 58 年特許願第 75878 号(特開昭  
59-204200 号、昭和 59 年 11 月 19 日  
発行 公開特許公報 59-2042 号掲載)につ  
いては特許法第17条の2の規定による補正があっ  
たので下記のとおり掲載する。 8 ( 1 )

Int. Cl. <sup>1</sup>	識別 記号	庁内整理番号
C07H 21/02 // C13Q 1/58 C01N 38/50		7417-4C A-6807-4B P-7065-2G

## B. 補正の内容

- (1) 発明の名称「2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体およびその製造法」を「2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体」に補正する。
- (2) 特許請求の範囲を別紙の通り補正する。
- (3) 明細書第4頁12～13行の「本発明は、……にも関する。」を削除する。
- (4) 同書第6頁15行から第7頁1行の「また、……〔VI〕」を削除する。
- (5) 「オリゴヌクレオチドの放射性」を「オリゴヌクレオチドの検出に放射性」に補正する。
- (6) 同書第8頁最終行～第9頁2行の「このよう……考えられる。」を削除する。
- (7) 同書第9頁7～8行の「蛍光検出体による」を「蛍光検出による」に補正する。
- (8) 同書第9頁15行～16行の間に「このよう……考えられるところから、本発明のDNP-ヌクレオチド誘導体の利用方法の拡大も考えられる。」を改行して挿入する。

平成 2. 2. -6 発行

予 設 補 正 書

平成 1 年 3 月 2 日

特許庁長官 吉 岡 文 雄 殿

## 1 事件の概要

昭和 58 年特許願第 75878 号

## 2 発明の名称

2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体

## 3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

徳永製薬株式会社

## 4 代理人(郵便番号 194)

東京都千代田区丸の内三丁目2番3号  
【電話東京 (231)2321 大代表】

0428 弁護士 佐 藤 一

## 5 補正命令の日付

発令日 平成 年 月 日

## 6 補正により減少する発明の数 ( )

## 7 補正の対象

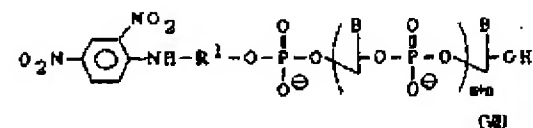
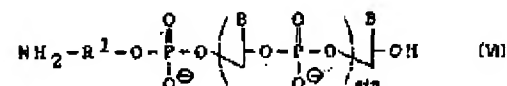
明細書の「発明の名称」、「特許請求の範囲」、及び「発明の詳細な説明」の各欄

特許庁

1 A 2 A

- (9) 同書第11頁12行の「一つの好ましい方法は、」と「前記の式〔VI〕」の間に下記の内容を挿入する。

「下式〔VI〕で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の末端アミノ基に、4-ジニトロベンゼンを結合させて下式〔VII〕で示されるDNP-オリゴデオキシリボヌクレオチドを得ることを特徴とするものである。」



(ただし、mおよびnはそれぞれ0または任意の自然数であり、R<sup>1</sup>は2価の連結または分岐性の炭化水素基であり、Bはヌクレオチドを構成する塩基である(Bが糖基関与するときは、それ

## 手続 2.2.-6 発行

もは同一でも異なってもよい。)

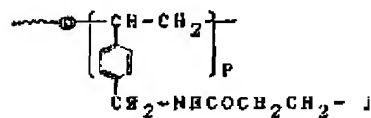
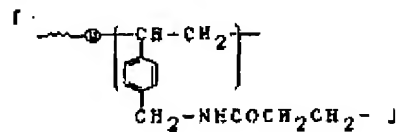
すなわち、この方法は、)

(10) 同書第16頁7行の「デオキシオリゴリボスクレオチド」を「オリゴデオキシリボスクレオチド」に補正する。

(11) 同書第17頁13行の「5'・水酸基末端」を「5'・末端」に補正する。

(12) 同書第18頁8行の「(1976年(丸帯)(特)発行)」を「(1976年、丸帯(特)発行)」に補正する。

(13) 同書第18頁最下行の



を

に補正する。

(14) 同書第19頁5行の「n' 2」を削除する。

(15) 同書第22頁2行の「アルドキシメイト」を「アルドキシム」に補正する。

(16) 同書第24頁3行の「4回抽出」を「4回試薬の除去」に補正する。

(17) 同書第24頁10行の「と反応させる。」を「と反応させる(対照実験3-1)。」に補正する。

(18) 同書第24頁13行の「を製造する。」を「を製造する。この実験をそれぞれ2-2、2-3、2-4とする。」に補正する。

(19) 同書第24頁下から3~2行の「実験2-2、2-3および2-4」を「実験3-2、3-3および3-4」に補正する。

(20) 同書第24頁最下行の「化合物を」を「化合物および対照実験3を」に補正する。

(21) 同書第25頁の第2表を次の通り補正する。

第 2 表

対 照 実 験 例	化合物の内容		対 照 実 験 例	化合物の内容	
	n	(B) <sub>n</sub> B		m+s	(B) <sub>m+s</sub> B
3-1	12	AAAAAAAAAA	2-1	14	AAAAAAAAAA
3-2	14	TTTTTTTTTT	2-2	14	TTTTTTTTTT
3-3	12	ATGCGTACGCGC	3-3	14	CGATCGTACGCGC
3-4	14	TTTGTGTGAGAGCGC	2-4	16	AATCTGCTGCGAGCTG

(22) 同書第26頁9~10行の「実験2-1」

を「実験3-1」に補正する。

(23) 同書第26頁10行の「実験1-1」を「実験2-1」に補正する。

(24) 同書第26頁11行の「実験2-2」を「実験3-2」に補正する。

(25) 同書第26頁12行の「実験1-2」を「実験2-2」に補正する。

(26) 同書第26頁13行の「実験2-3」を「実験3-3」に補正する。

「実験2-3」に補正する。

(28) 同書第26頁14~16行の「実験2-4……実験1-4」を「実験3-4で式(8)である化合物、すは実験2-4」に補正する。

JP,59-204200,A

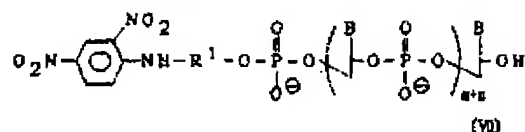
☒ STANDARD ☐ ZOOM-UP ROTATION ☐ No Rotation ☐ REVERSAL

RELOAD PREVIOUS PAGE | NEXT PAGE

平成 2. 2. -6 発行

特許請求の範囲

1. 下式〔VII〕で示される 2, 4-ジニトロフェニル・オリゴデオキシリボヌクレオチドであることを特徴とする、2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。



(ただし、m および n はそれぞれ 0 または任意の自然数であり、 $\text{R}^1$  は 2 糖の塩基または分岐鎖の炭化水素基であり、B はヌクレオチドを構成する塩基である (B が複数存在するときは、それらは同一でも異なってもよい)。)

2. 塩基 B がアデニン、チミン、シトシンおよびグアニンからなる群より選ばれたものである、特許請求の範囲第 1 項記載の 2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。

3.  $\text{R}^1$  が炭素数 2 ~ 20 の直鎖または分岐

鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第 1 項または第 2 項記載の 2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。

4. m が 0 または 6 までの自然数、n が 0 または 40 までの自然数である、特許請求の範囲第 1 ~ 3 項のいずれか一項に記載の 2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。